

Resistencia antimicrobiana y epidemiología molecular en cepas de *Salmonella* entérica serovar Enteritidis aisladas en las provincias de Chaco y Corrientes (Argentina)

Merino, Luis A.⁽¹⁾; Ruiz, Joaquim⁽²⁾;
Alonso, José M.⁽¹⁾; Vila, Jordi⁽³⁾

⁽¹⁾ Instituto de Medicina Regional. Universidad Nacional del Nordeste. Av. Las Heras 727. 3500 Resistencia (Argentina). Correo electrónico: lamerino@gigared.com

⁽²⁾ Centro de Salud Internacional. IDIBAPS, Hospital Clínic. Barcelona (España)

⁽³⁾ Dpto. de Microbiología. Instituto de Infecciones e Inmunología. IDIBAPS, Hospital Clínic. Barcelona (España).

biotipos, fagos y colicinas, pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, perfil plasmídico, análisis del ADN cromosómico total por electroforesis en campo pulsátil (PFGE), estudio de secuencias IS200, análisis mediante PCR de las secuencias REP (repetitive extragenic palindromic) y ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus)⁷.

Objetivos

Los objetivos del presente proyecto fueron estudiar la resistencia antimicrobiana de cepas de *Salmonella* Enteritidis de origen humano aisladas de muestras provenientes del Nordeste de Argentina, e investigar la relación epidemiológica existente entre las diferentes cepas.

Introducción

Las infecciones causadas por cepas de *Salmonella* pueden producir patologías que varían en severidad desde disturbios intestinales leves hasta la muerte, y aunque los antimicrobianos no son esenciales para el tratamiento de la mayoría de los casos de infecciones intestinales, son útiles en las infecciones extraintestinales y en pacientes inmunocomprometidos⁸.

Salmonella entérica serotipo Enteritidis (*Salmonella* Enteritidis) representa el serotipo más frecuente en Argentina¹² así como en otros países¹¹. Entre 1998 y 1999 se encontró que a escala nacional el 45,9% de los aislamientos correspondía a este serotipo, seguido por *S. Infantis* (19,2%), *S. Agona* (16,1%) y *S. Typhimurium* (15%).

Para lograr una efectiva vigilancia sobre la sensibilidad a los antimicrobianos y para poder desarrollar estrategias racionales de control, es crucial la disponibilidad de datos seguros y detallados acerca de la epidemiología de *Salmonella*. Con estos propósitos, se han utilizado diversas técnicas de tipificación en los estudios epidemiológicos para diferenciar los aislamientos de serovares de *Salmonella* provenientes de diferentes orígenes, entre las cuales se incluyen la tipificación por

Materiales y métodos

Se analizaron 24 cepas de *Salmonella* spp recuperadas entre 1997 y 2003 a partir de pacientes atendidos en centros asistenciales privados y estatales de las provincias de Chaco y Corrientes (Argentina). Seis de ellas provenían de dos brotes de intoxicación alimentaria y el resto eran aislamientos sin relación epidemiológica aparente.

Mediante pruebas bioquímicas clásicas³ se procedió a confirmar la identidad de las cepas, las que fueron conservadas en agar blando a temperatura ambiente y en caldo glicerinado al 15% a -20°C a fin de ser utilizadas en estudios posteriores.

Se realizó una identificación serológica inicial mediante técnica de aglutinación en placa con antiseros polivalentes dirigidos contra los antígenos somáticos de *Salmonella* (OMA y OMB - Sanofi Pasteur)³ y posteriormente las cepas fueron enviadas al Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" (Buenos Aires, Argentina) donde se determinó la serovariedad mediante la determinación de los antígenos somáticos y flagelares y sus respectivos factores.



Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana se realizaron mediante el método de difusión con discos según recomendaciones del CLSI (anteriormente National Committee for Clinical Laboratory Standards - NCCLS)9 frente a ampicilina 10 µg (AMP), ampicilina/sulbactama 10/10 µg (AMS), cefalotina 30 µg (CEF), gentamicina 10 µg (GEN), ciprofloxacino 5 µg (CIP), ácido nalidixico 30 µg (NAL), colistina 10 µg (COL), fosfomicina 200 µg (FOS), tetraciclina 30 µg (TET), cloranfenicol 30 µg (CMP), neomicina 30µg (NEO), furazolidona 100 µg (FUR), trimetoprima/sulfametoxazol 1,25/23,75 µg (TMS) y sulfisoxazol 300 µg (SUL).

El control de calidad se realizó utilizando las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

La producción de β-lactamasas se determinó en las cepas resistentes a ampicilina mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando los iniciadores para blaTEM (5'-TTGGGTGCACGAGTGGGTTA-3' y 5'-GACAGTTACCAATGCTTAATCA-3') y blaSHV (5'-ATGCGTTATATTCGCCTGTG-3' y 5'-tagcgttgccagtgctcg3'-) y parámetros de amplificación previamente descritos6. Como controles positivos se utilizaron cepas poseedoras de genes codificantes de las β-lactamasas estudiados.

La técnica de amplificación de secuencias REP (repetitive extragenic palindromic) por PCR fue aplicada usando los iniciadores REP1 (5'-GCGCCGICATGCGGCATT-3') y REP2 (5'-ACGCCTTATCCGGCCTAC-3') en forma conjunta y por separado de acuerdo al método descrito previamente2. De cada producto final de la PCR, 20 µl se sometieron a electroforesis sobre gel de agarosa al 2% conteniendo 0,5 µg/ml de bromuro de etidio.

Resultados

La edad de los pacientes a partir de los cuales se aislaron las cepas varió entre 7 y 44 años, con una media de 27,5 años. Un aislamiento fue obtenido de esputo de un paciente inmunosuprimido ingresado en una Unidad de Cuidados Intensivos, otro aislamiento fue recuperado de orina de un paciente del sexo femenino sin síntomas gastrointestinales pero portador de *Salmonella* en heces y el resto fue obtenido de heces de pacientes con gastroenteritis aguda.

En el presente trabajo, los resultados de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana mostraron que todos los aislamientos fueron sensibles a AMS, CEF, COL, FOS, TET, CMP, NEO, GEN, NAL, CIP, TMS y SUL, pero presentaron variaciones en la sensibilidad frente a FUR (13 cepas resistentes) y AMP (2 cepas resistentes).

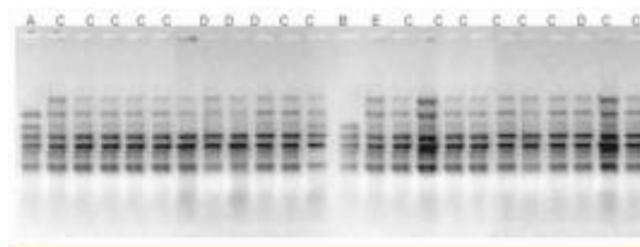
En las cepas resistentes a AMP se obtuvo un fragmento de 850 bp con los cebadores para blaTEM (Figura 1) pero no con blaSHV.



Fig. 1: PCR de las cepas de *Salmonella* Enteritidis utilizando los cebadores blaTEM. Líneas 1 y 2: cepas en estudio. Línea 3: control positivo. Línea 4: control negativo. Línea 5: Marcador de pesos moleculares de 100 bp.

En cuanto a la aplicación de la técnica de REP-PCR, los mejores resultados en el presente trabajo se obtuvieron al utilizar los iniciadores REP1 solamente, pudiéndose clasificar a los aislamientos en 5 perfiles de bandas a los cuales se les asignaron letras mayúsculas de la A a la E (Figura 2).

Fig.2. Patrones de ADN de *Salmonella* Enteritidis generados mediante REP-PCR y separados en gel de agarosa al 2%. Las letras asignadas a las líneas corresponden a cada perfil obtenido.



En definitiva, las cepas estudiadas pudieron clasificarse en 9 patrones epidemiológicos (I a IX) los cuales se obtuvieron combinando los perfiles de susceptibilidad frente a FUR y AMP con los patrones de banda obtenidos mediante REP-PCR, los cuales se presentan en la Tabla 1.

Discusión

Dentro de la resistencia adquirida en *Salmonella* Enteritidis, preocupa principalmente la resistencia a betalactámicos, quinolonas y trimetoprima/sulfametoxazol, debido a que son antimicrobianos de elección en el tratamiento de la salmonelosis.

Entre las β-lactamasas encontradas en *Salmonella*, TEM-1 es la que más frecuentemente se asocia con la resistencia AMP y CEF en Argentina, mientras que SHV es menos frecuente12, precisamente es esta clase de betalactamasa la encontrada en el presente trabajo.

Debe destacarse el hecho de que más del 50% de las cepas de *Salmonella* Enteritidis incluidas presentaron

resistencia sólo a FUR, en concordancia con los resultados hallados a nivel nacional por Rossi y cols., quienes informaron una resistencia del 34,3% frente a ese antimicrobiano, mientras que frente a AMP sólo el 11% fueron resistentes¹². Sin embargo, Tassios y cols. estudiaron en Grecia los aislamientos de *Salmonella* Enteritidis durante los años 1987 a 1993 y hallaron que sobre 300 cepas, el 25% fueron resistentes a FUR, resistencia superada sólo por AMP y SUL13, lo cual indica que la variación entre países es muy grande y podría estar influida por el grado de utilización de este antimicrobiano en cada uno de ellos.

La identificación de la relación genética entre aislamientos bacterianos a partir de una epidemia o el estudio de la persistencia endémica de ciertas cepas es frecuentemente una cuestión crítica para tomar decisiones orientadas hacia la prevención de la diseminación de la infección y erradicación de la fuente. Numerosos trabajos acerca de este hecho pueden ser encontrados en publicaciones científicas, en los cuales fueron aplicados métodos fenotípicos y genotípicos para diferenciar aislamientos humanos, animales, alimentarios y ambientales de *Salmonella*^{1,7}.

El patrón genómico basado en las técnicas de REP-PCR, ha sido hallado de utilidad para tipificar aislamientos esporádicos y epidémicos de *Salmonella*. Versalovic y cols. aplicaron la técnica de PCR para amplificar las secuencias REP en diferentes serovares de *Salmonella* y otras bacterias gramnegativas¹⁴. Chmielewski y cols. compararon el poder de discriminación de los perfiles obtenidos mediante REP-PCR y ERIC-PCR y concluyeron que ambas técnicas resultaron muy útiles para la tipificación de *Salmonella* Enteritidis⁵.

En el presente trabajo la tipificación mediante amplificación de secuencias repetitivas fue más útil para descartar la relación clonal entre aislamientos con igual perfil de susceptibilidad antibiótica y aunque se pudieron diferenciar los aislamientos en varios genotipos, la aplicación de otras técnicas de tipificación como ERIC-PCR y PFGE^{7,10} ayudaría a confirmar o descartar la relación genética entre aquellos que presentaron igual patrón de bandas pero que no poseían una relación epidemiológica aparente.

Según los datos existentes en la bibliografía^{1,4}, *Salmonella* Enteritidis es el principal serotipo implicado tanto en brotes de origen alimentario como en casos "aparentemente" esporádicos, el estudio de la relación clonal de las cepas mediante diferentes marcadores ayudaría a comprender mejor la real epidemiología de las gastroenteritis en nuestro medio.

Conclusión

La aplicación de técnicas de tipificación molecular en combinación con características fenotípicas y datos epidemiológicos permitió confirmar la existencia de brotes

infecciosos que de otra manera sólo hubieran quedado en el ámbito de las especulaciones.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento a la Sociedad Española de Infectología y Microbiología Clínica y a la Secretaría General de Ciencia y Técnica de la U.N.N.E. por la ayuda otorgada para que el Bioq. Luis A. Merino realice parte de este trabajo en los laboratorios del Hospital Clínic de Barcelona; al personal del Instituto de Infecciones e Inmunología IDIBAPS del Hospital Clínic por la colaboración brindada y a las bioquímicas Cech, Lodeiro, Cacciamani, Pato, Esquivel, Pellegrino y Gómez Omil de Monzón, por la provisión de las cepas incluidas en el presente trabajo.

Bibliografía

1. Adesiyun A, Carson A, McAdoo K, Bailey C. Molecular analysis of *Salmonella* Enteritidis isolates from the Caribbean by pulsed-field gel electrophoresis. *Pan Am J Public Health* 2000; 8:342-347.
2. Beyer, W.; Mukendi, F.M.; Kimming, P., Böhm, R. Suitability of repetitive-DNA-sequence-based PCR fingerprinting for characterising epidemic isolates of *Salmonella enterica* serovar Saintpaul. *J Clin Microbiol* 1998; 36:1549-1554.
3. Bopp CA, Brenner FW, Wells JG, Strockbine NA. *Escherichia, Shigella and Salmonella*. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds). *Manual of Clinical Microbiology*, 7th ed. Washington, DC, ASM Press. 1999: 459-474.
4. Centers for Disease Control and Prevention. Preliminary FoodNet data on the incidence of foodborne illness - Selected sites, United States, 1999. *Morb Mortal Wkly Rep* 2000; 49:201-205.
5. Chmielewski R, Wieliczko M, Kuczkowski M, Mazurkiewicz M, Ugorski M. Comparison of ITS profiling, REP- and ERIC-PCR of *Salmonella* Enteritidis isolates from Poland. *J Vet Med* 2002; B49:163-168.
6. Gallardo F, Ruiz J, Towner KJ, Vila J. Increase in incidence of resistance to ampicillin, chloramphenicol and trimethoprim in clinical isolates of *Salmonella* serotype Typhimurium with investigation of molecular epidemiology and mechanisms of resistance. *J Med Microbiol* 1999; 48:367-374.
7. Milleman Y. Les marqueurs épidémiologiques des salmonelles. *Vet Res* 1998; 29:3-19.
8. Miller SI, Hohmann EL, Pegues DA. *Salmonella* (including *Salmonella* Typhi). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). *Principios y práctica*. vol. 2. 4th edn. Editorial Médica Panamericana, Bs. As. 1997: 2013-2033.
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 9th Informational Supplement. NCCLS, 940



Tabla I: Relación entre las características fenotípicas y genotípicas de los aislamientos de *Salmonella* Enteritidis.

Cepa	Muestra	Origen	Fecha	AMP	FUR	REP-PCR	Tipos	Epidemiología
LG4	Heces	Resistencia	20/12/99	R	R	C	I	nr
HLL584	Heces	Corrientes	27/06/01	R	S	C	II	nr
AC1	Heces	Corrientes	15/11/00	S	R	A	III	nr
LB144752	Heces	Corrientes	15/02/00	S	R	C	IV	nr
HLL22	Heces	Corrientes	25/01/01	S	R	C	IV	nr
LB31842	Orina	Corrientes	16/08/01	S	R	C	IV	nr
HLL502	Heces	Corrientes	20/02/02	S	R	C	IV	nr
LB205824	Heces	Corrientes	03/10/02	S	R	C	IV	nr
LB216922	Heces	Corrientes	07/05/03	S	R	C	IV	r
LB216991	Heces	Corrientes	07/05/03	S	R	C	IV	r
PEZ2	Heces	Corrientes	07/05/03	S	R	C	IV	r
LB218679	Heces	Corrientes	09/06/03	S	R	C	IV	r
HP21	Heces	Corrientes	15/12/98	S	S	D	IX	nr
ID4772	Espudo	Corrientes	18/11/99	S	S	D	IX	nr
ID10611	Heces	Corrientes	10/11/00	S	S	D	IX	nr
LG3	Heces	Resistencia	15/12/99	S	R	D	V	nr
LG5	Heces	Resistencia	28/12/99	S	R	E	VI	nr
LB142131	Heces	Corrientes	13/01/00	S	S	B	VII	nr
LB73939	Heces	Corrientes	19/12/97	S	S	C	VIII	nr
SP57	Heces	P. R. Sáenz Peña	14/04/98	S	S	C	VIII	nr
LB103112	Heces	Corrientes	10/05/98	S	S	C	VIII	r
LB103113	Heces	Corrientes	12/05/98	S	S	C	VIII	r
HLL901	Heces	Corrientes	14/07/01	S	S	C	VIII	nr
HLL179	Heces	Corrientes	06/03/02	S	S	C	VIII	nr

Abrev.: AMP: ampicilina, FUR: furazolidona, S: sensible, R: resistente, r: epidemiológicamente relacionada, nr: sin relación epidemiológica

- West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania. 2003.
- Olive DM, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol* 1999; 37:1661-1669.
 - Preliminary Foodnet data on the incidence of foodborne illness - Selected sites, United States, 1999, *Morb Mortal Wkly Rep* 2000; 49:201-205.
 - Rossi MA, Galas M, Caffer MI, Tokumoto M, Guelfand L, Binsztein N. Surveillance of *Salmonella* enterica antimicrobial resistance en Argentina. Different serovars, different resistance profile. Abstract 43.008. Abstract Book of the 9th International Congress on Infectious Diseases, Buenos Aires, Argentina. 2000: 86.
 - Tassios PT, Markogiannakis A, Vatopoulos AC, et al. Molecular epidemiology of antibiotic resistance of *Salmonella* Enteritidis during a 7-year period in Greece. *J Clin Microbiol* 1997; 35:1316-1321.
 - Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* 1991; 19:6823-6831.